

И.В. САМСОНОВА, В.А. КЛОПОВА, И.С. ШЕВЧЕНКО**ЭКСПРЕССИЯ КОЛЛАГЕНОВ IV И VI ТИПОВ
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАНКРЕАТИТЕ**УО «Витебский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь

Цель. Изучить экспрессию коллагенов IV и VI типа в поджелудочной железе при хроническом панкреатите (ХП).

Материал и методы. С использованием морфологического, иммуногистохимического, морфометрического и статистического методов исследованы образцы ткани поджелудочной железы 28 пациентов с ХП, окрашенные с использованием лиофилизированных моноклональных антител Collagen Type IV и Collagen Type VI (Novocastra). Контрольную группу составили 7 образцов поджелудочной железы без патологии умерших в результате несчастных случаев.

Результаты. Коллаген IV-позитивная реакция определялась как различной интенсивности коричневое окрашивание базальной мембраны в стенке сосудов, протоков и в ацинарных отделах экзокринной части всех образцов поджелудочной железы. При ХП экспрессия составила $750,2 \pm 2,86$, что соответствовало $1093297,22 \pm 3340,36$ мкм² суммарной площади экспрессии. В контрольной группе уровень экспрессии был достоверно выше – $924,11 \pm 8,5$, однако суммарная площадь экспрессии была значимо меньше – $751045,11 \pm 10096,45$ мкм².

Экспрессия коллагена VI в ткани поджелудочной железы без патологии определялась преимущественно в клетках соединительной ткани и практически отсутствовала в ацинарных клетках. При ХП экспрессия коллагена VI отмечалась преимущественно в базальной части цитоплазмы клеток ацинусов и протокового эпителия и в клетках соединительной ткани. Экспрессия маркера в контрольной группе составила $615,15 \pm 19,34$, в опытной – $85524,08 \pm 3433,07$ мкм². Среднее значение площади позитивно проэкспрессировавших клеток в опытной группе составило $241506,09$ мкм², что в 2,8 раза превышало таковой показатель в контрольной группе.

Заключение. Хронический панкреатит характеризуется изменением интенсивности, характера распределения и площади экспрессии коллагенов IV и VI типа в поджелудочной железе. Надо полагать, что выявленные нами изменения экспрессии коллагенов IV и VI типов взаимно обусловлены и являлись следствием нарушения коллагенообразования при хроническом воспалении, что, в свою очередь, определялось активацией мезенхимальных клеток при воспалении, их пролиферацией, изменением активности эпителиоцитов.

Ключевые слова: поджелудочная железа, хронический панкреатит, коллаген IV, коллаген VI, иммуногистохимическое исследование, пролиферация, активность эпителиоцитов

Objective. To study collagen IV and VI expression in pancreas at chronic pancreatitis (CP).

Methods. Using morphological, immunohistochemical, morphometric and statistical methods the pancreatic tissue specimens of 28 patients with CP, stained with lyophilised monoclonal antibodies Collagen Type IV and Collagen Type VI (Novocastra) have been investigated. Control group included 7 pancreatic head specimens without any pathology of pancreas taken from people died due to by accidents.

Results. Collagen IV-positive reaction was determined as different intensity brown staining of basement membrane in the wall of vessels, ducts and in acini of all pancreatic specimens. At CP the expression level was $750,2 \pm 2,86$, that corresponded to $1093297,22 \pm 3340,36$ mkm² total expression area. In control group the expression was significantly higher – $924,11 \pm 8,5$, but total expression area was significantly lower – $751045,11 \pm 10096,45$ mkm².

In pancreas without pathologic changes expression of collagen VI was mainly determined in the connective tissue cells and was almost absent in the acinar cells. At CP collagen VI positive expression was mainly determined in the basal part of acinar cell and duct epithelium cytoplasm as well as in the connective tissue cells. In control group expression was $615,15 \pm 19,34$ mkm², at CP – $85524,08 \pm 3433,07$ mkm². The expression total area at CP was 241506 мкм², that was 2,8 fold more high comparing with control group.

Conclusion. The chronic pancreatitis is characterized by changes of the Collagen Type IV and Collagen Type VI expression degree, character of distribution and expression area in the pancreas. It is supposed the revealed changes of Collagen Type IV and Collagen Type VI expression to result from collagen synthesis disturbances at chronic inflammation, that can explained by activation of mesenchimal cells, their proliferation and changes of epitheliocytes activity.

Keywords: pancreas, chronic pancreatitis, collagen IV, collagen VI, immunohistochemical investigation, proliferation, epitheliocytes activity

Введение

Согласно современным представлениям, под термином «хронический панкреатит» обозначают группу хронических заболеваний поджелудочной железы различной этиологии, преимущественно воспалительной природы с фазопрогрессирующими очаговыми, сегментарными или диффузными дегенеративными или деструктивными изменениями ее экзокринной ткани, атрофией железистых элементов (панкреоцитов) и замещением их соединительной (фиброзной) тканью, изменениями в протоковой системе поджелудочной железы с образованием кист, кальцификатов и конкрементов, с различной степенью нарушений экзокринной и эндокринной функций [1].

Прогрессирующая атрофия железистой ткани, распространение фиброза и замещение соединительной тканью клеток паренхимы поджелудочной железы являются основными гистологическими признаками хронического панкреатита (ХП) [2]. Данные изменения являются необратимыми и имеют тенденцию к прогрессированию [3].

В основе развития фиброза лежит избыточное накопление коллагена и других компонентов экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), продуцируемых активированными панкреатическими звездчатыми клетками (ПЗК). М. Arpe et al. [4, 5] показали, что в ответ на повреждение или воспаление поджелудочной железы (ПЖ) звездчатые клетки претерпевают морфологические и функциональные изменения: превращаются в миофибробласт-подобные клетки, которые экспрессируют α -SMA (α -smooth muscle actin) – активированные ПЗК. При этом клетки теряют гранулы витамина А, активно пролиферируют, мигрируют и продуцируют компоненты ЭЦМ. Кроме того, активированные ПЗК экспрессируют провоспалительные цитокины, хемокины и молекулы клеточной адгезии, способствующие усилению воспаления.

В настоящее время известно 19 типов коллагена, которые отличаются друг от друга по первичной структуре пептидных цепей, функциям и локализации в организме. 19 типов коллагена подразделяют на несколько классов в зависимости от того, какие структуры они могут образовывать: фибриллообразующие, ассоциированные с фибриллами коллагена, сетевидные, микрофибриллы, заякоренные фибриллы и др.

Коллаген IV типа является одним из белков ЭЦМ, который представлен шестью различными α -цепями ($\alpha 1(IV)$ – $\alpha 6(IV)$), в разных комбинациях формирующих тройные спиральные молекулы (протомеры). Протомеры прерываются во многих местах, что позволяет им иметь множественные изгибы и гибкую структуру. За счет взаимодействия С-концевых глобулярных доменов друг с другом происходит образование димеров. Далее происходит образование полигональной ячеистой сети за счет того, что спиральные домены разных молекул взаимодействуют друг с другом бок о бок. N-концевые домены, выступающие из плоскости белковой сети, участвуют в образовании многослойной сети за счет формирования ковалентных поперечных связей (дисульфидных и других). Образовавшаяся в результате многослойная сеть молекул, стабилизированная поперечными ковалентными связями, служит основой базальной мембраны [6, 7]. В ряде исследований показано, что белок стимулирует пролиферацию и миграцию клеток рака поджелудочной железы, а высокий уровень экспрессии маркера ассоциируется с плохим прогнозом новообразования [8, 9].

К коллагенам, образующим микрофибриллы, относят коллаген VI типа. Являясь короткоцепочечным белком, он образует микрофибриллы, располагающиеся между фибриллами интерстициальных коллагенов. Молекулы этого коллагена содержат многочисленные последовательности арг-гли-асп (RGD), которые обеспечивают клеточную адгезию путем присоединения к мембранным адгезивным белкам – интегринам $\alpha 1\beta 1$ и $\alpha 2\beta 1$. Кроме того, коллаген VI типа способен связываться с фибриллами интерстициальных коллагенов, протеогликанами и гликозаминогликанами, обеспечивая тем самым прочную связь между клетками и внеклеточным матриксом [10].

Имеются многочисленные работы по исследованию изменения содержания коллагенов I и III типов в ткани поджелудочной железы при хроническом панкреатите. При этом в доступной литературе сведения о роли нарушений образования коллагенов IV и VI в прогрессирующем фиброзе немногочисленны и противоречивы.

Цель работы. Изучить экспрессию коллагенов IV и VI типа в поджелудочной железе при хроническом панкреатите.

Материал и методы

Материалом для морфологического исследования служили участки 28 образцов ткани поджелудочной железы пациентов с хроническим панкреатитом, которым была выполнена дуоденумсохраняющая резекция в ОНПЦ «Хирургия заболеваний печени и поджелудочной железы» на базе Витебской областной клинической больницы, и участки 7 образцов поджелудочной железы без патологии, полученные в отделе общих экспертиз Управления по Витебской области Государственной службы медицинских судебных экспертиз от умерших в результате несчастных случаев.

Материал фиксировали в 10%-ом забуференном формалине. После стандартной гистологической проводки изготавливали серийные срезы толщиной 5-7 мкм. Окраска биоптатов осуществлялась гематоксилин-эозином и иммуногистохимически с использованием моноклональных антител к коллагенам IV и VI (Leica, UK). Изменения в ткани поджелудочной железы оценивали при увеличении $\times 100$, $\times 200$. Для морфологической и морфометрической оценки экспрессии коллагенов IV и VI типов использовалась компьютерная система анализа изображений (микроскоп Leica DM 2000 с цифровой камерой и лицензионной программой Leica Application Suite, Version 3.6.0). Полученные фотографии обрабатывались с использованием компьютерной программы Image J1.45s, в рамках которой количественно оценивали интенсивность иммуногистохимического окрашивания препаратов.

При статистической обработке полученных морфометрических данных определяли среднее значение (\bar{x}), стандартное отклонение (σ). Для проверки достоверных различий между группами использовали параметриче-

ские методы оценки (для оценки характера распределения полученных данных использовали критерий Шапиро-Уилка (W)). Для сравнения двух независимых групп между собой по количественным признакам использовали двухвыборочный Т-тест с неравными дисперсиями. Критическое значение уровня значимости при проверке статистических гипотез принималось равным 5% ($p < 0,05$).

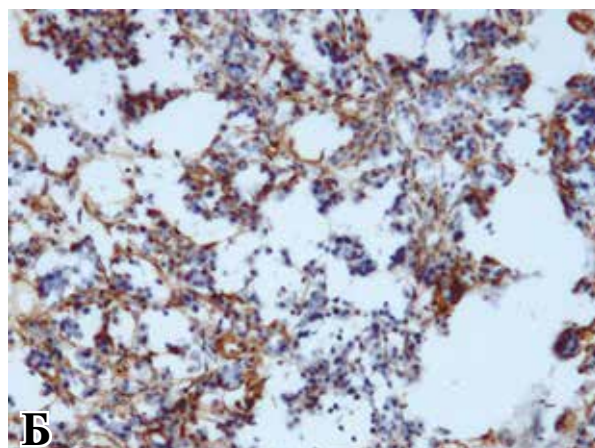
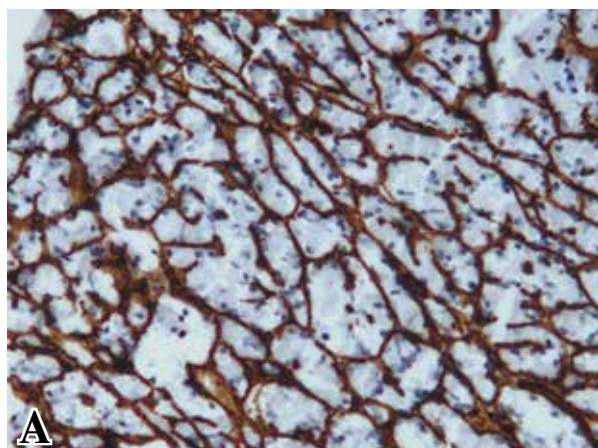
Результаты

Микроскопически иммуногистохимическая коллаген IV-позитивная реакция определялась как окрашивание базальной мембраны в различной интенсивности (от светло- до темно-коричневого) коричневый цвет в стенке сосудов, протоков и в ацинарных отделах экзокринной части ткани всех образцов поджелудочной железы (рис. 1). При этом морфометрическая оценка окрашенных серийных срезов показала неодинаковый уровень его экспрессии в образцах поджелудочной железы опытной и контрольной групп.

В образцах поджелудочной железы при хроническом панкреатите отмечалась довольно высокая степень экспрессии коллагена IV. При этом уровень экспрессии составил $750,2 \pm 2,86$, что соответствовало $1093297,22 \pm 3340,36$ мкм² суммарной площади экспрессии. В контрольной группе уровень экспрессии был достоверно выше — $924,11 \pm 8,5$, однако суммарная площадь экспрессии была значительно меньшей — $751045,11 \pm 10096,45$ мкм² (таблица).

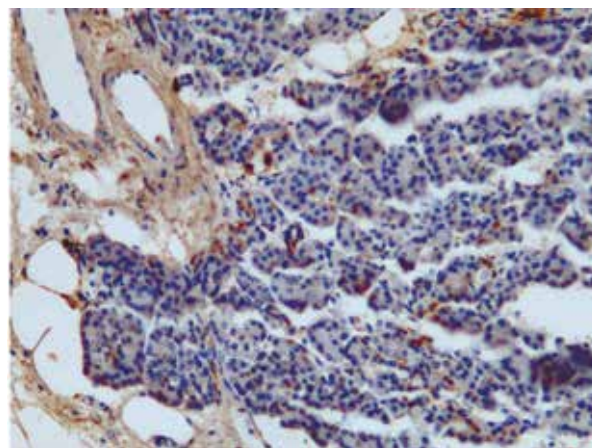
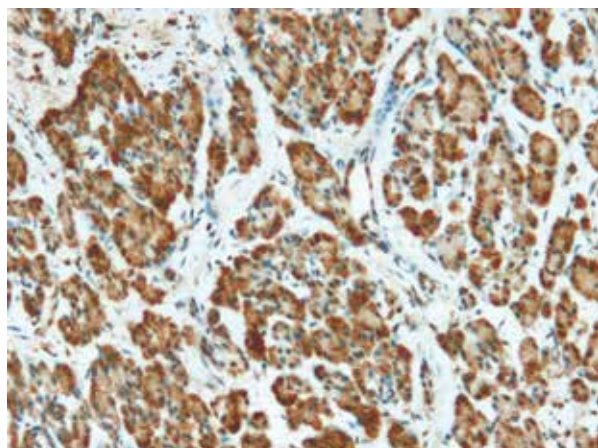
Экспрессия коллагена VI наблюдалась в виде мелкогранулярного или гомогенного цитоплазматического, преимущественно в базальной части окрашивания клеток ацинусов и протокового эпителия как при хроническом панкреатите, так и в образцах без патологии

Рис. 1. Экспрессия Collagen IV в образцах поджелудочной железы при хроническом панкреатите (А) и нормальной поджелудочной железы (Б). Окраска lyophilized collagen type IV. Ув. $\times 200$.



Показатели экспрессии коллагена VI и VI типов в поджелудочной железе при хроническом панкреатите и без патологии ($M \pm \sigma$)

Исследуемая группа	Коллаген IV		Коллаген VI	
	количество	площадь, мкм ²	количество	площадь, мкм ²
Хронический панкреатит	750,2 \pm 2,86	1093297,22 \pm 3340,36	1409,92 \pm 7,21	241506,09 \pm 21000,92
контроль	924,11 \pm 8,5	751045,11 \pm 10096,45	615,15 \pm 19,34	85524,08 \pm 3433,07
p (T-test)	p=0,0005	p<0,000001	p<0,000001	p=0,000002

Рис. 2. Экспрессия Collagen VI в образцах поджелудочной железы при хроническом панкреатите (А) и нормальной поджелудочной железы (Б). Окраска lyophilized collagen type VI. Ув. $\times 200$.

(рис. 2). Кроме того, позитивная реакция отмечалась и в клетках соединительной ткани образцов исследуемой и контрольной групп. При этом в ткани поджелудочной железы без патологии коллаген VI встречался преимущественно в клетках соединительной ткани и практически отсутствовал в ацинарных клетках. В то же время в опытной группе количество положительно проэкспрессировавших клеток и площадь их распределения в ацинасах поджелудочной железы визуально были выше.

Проведенная морфометрическая оценка выраженности экспрессии определила статистически значимое увеличение как количества позитивных клеток, так и суммарной площади экспрессии маркера в образцах поджелудочной железы при хроническом панкреатите. В контрольной группе экспрессия маркера составила $615,15 \pm 19,34$, в опытной — $85524,08 \pm 3433,07$ мкм². Площадь позитивно проэкспрессировавших клеток колебалась от 363 до 1563280 мкм² в опытной группе и от 1088 до 489625 мкм² — в контрольной. Среднее значение составило соответственно 241506,09 и 85524,08 мкм².

Обсуждение

Известно, что коллаген IV типа является одним из белков ЭЦМ, который формирует супрамолекулярную сеть базальной мембраны, оказывающую влияние на адгезию, миграцию

и дифференциацию эпителиальных клеток [11]. В свою очередь, состояние и дифференцировка эпителиоцитов ацинусов и протокового эпителия, зависящие от уровня коллагена IV типа, определяют их способность секретировать и уровень секреции коллагена VI типа.

Коллаген VI встречается во многих тканях около базальной мембраны, где он служит в качестве крепежного соединения. Помимо фибробластов он может синтезироваться и другими клетками. О. Nishi et al. [12] показали способность клеток роговицы глаза секретировать различные виды коллагена, в том числе и коллаген VI типа.

J.F. Groulx et al. [10], изучавшие распределение и роль коллагена VI в базальной мембране эпителиоцитов в кишечнике, показали, что коллаген VI является компонентом базальной мембраны эпителия и представляет собой главный тип коллагена эпителиального происхождения в этом органе. Также он влияет на поведение эпителиальных клеток за счет регуляции эпителиально-клеточных-фибронектин взаимодействий.

M. Ruhl et al. [13] показали, что растворимый коллаген VI типа увеличивает de novo синтез ДНК в фибробластах до 100 раз по сравнению с растворимым коллагеном I. Также они продемонстрировали, что коллаген VI ингибирует апоптоз клеток. Коллаген VI-зависимое ингибирование апоптоза может иметь место в

процессе эмбриогенеза, заживления ран и при фиброзе. Авторы пришли к выводу, что повышенное содержание коллагена VI в ткани и в крови обеспечивает активацию мезенхимальных клеток и их пролиферацию.

Полученные нами данные по изменению характера и интенсивности экспрессии коллагена VI при хроническом панкреатите коррелируют с данными исследований J.F. Groulx et al. [10, 14], указывающими на способность эпителиальных клеток секретировать коллаген VI типа. Он показал, что в процессе синтеза внутри клетки две молекулы этого коллагена соединяются антипараллельно с образованием димера, а из димеров образуются тетрамеры, которые секретируются из клетки. Вне клетки тетрамеры связываются «конец в конец» с формированием микрофибрилл.

Наблюдаемая нами на участках с выраженным фиброзом экспрессия коллагена VI в клетках соединительной ткани и незначительное его содержание в межклеточном матриксе связано, надо полагать, с тем, что во внеклеточном матриксе коллаген VI типа служит для сшивки крупных фибрилл коллагена II, III типов и др. P.C. Sabatelli et al. [15] в своих исследованиях показали, что коллаген VI влияет на трехмерную организацию фибронектина во внеклеточном матриксе культивируемых фибробластов.

Долгое время основной функцией макрофагов в соединительной ткани считалось разрушение поврежденных компонентов клеток и межклеточного вещества. Однако макрофаги способны индуцировать клетки к пролиферации и синтезу компонентов внеклеточного матрикса, что способствует восстановлению тканей. Кроме этого доказано, что макрофаги способны самостоятельно секретировать компоненты внеклеточного матрикса, такие, как фибронектин и коллаген VI типа. M. Schnoor et al. [16] показали, что моноциты и макрофаги могут синтезировать практически все известные коллагены и коллагены, связанные с мРНК. Кроме того, способность макрофагов секретировать коллаген типа VI зависит от способа их активации, стадии дифференцировки и плотности клеток.

Таким образом, выполненное нами исследование показало присутствие коллагенов IV и VI типа в поджелудочной железе как в контрольной группе, так и в опытных образцах, отличавшееся по интенсивности, характеру распределения и площади экспрессии. Надо полагать, что выявленные нами изменения экспрессии коллагенов IV типа и VI типа были взаимно обусловлены и являлись след-

ствием нарушения коллагенообразования при хроническом воспалении. Это, в свою очередь, определялось активацией мезенхимальных клеток при воспалении, их пролиферацией, изменением активности эпителиоцитов.

Выводы

1. Хронический панкреатит сопровождается достоверным повышением экспрессии коллагена IV типа с уменьшением количества коллаген IV-позитивных клеток.

2. У пациентов с хроническим панкреатитом наблюдается достоверно значимое увеличение экспрессии коллагена VI и площади распределения положительно проэкспрессировавших клеток в ацинусах поджелудочной железы.

3. Изменение характера и интенсивности экспрессии коллагенов IV и VI типов отражают активную структурно-функциональную перестройку паренхимы поджелудочной железы с развитием выраженного фиброза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Минушкин О. Н. Хронический панкреатит: некоторые аспекты патогенеза, диагностики и лечения / О. Н. Минушкин // *Consilium Medicum*. — 2002. — Т. 4, № 1. — С. 23–26.
2. Губергриц Н. Б. Клиническая панкреатология : моногр. / Н. Б. Губергриц, Т. Н. Христич. — Донецк : Лебедь, 2000. — 416 с.
3. The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis / P. Layer [et al.] // *Gastroenterology*. — 1994 Nov. — Vol. 107, N 5. — P. 1481–87.
4. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture / M. V. Apte [et al.] // *Gut*. — 1998 Jul. — Vol. 43, N 1. — P. 128–33.
5. The fibrosis of chronic pancreatitis: new insights into the role of pancreatic stellate cells / M. Apte [et al.] // *Antioxid Redox Signal*. — 2011 Nov 15. — Vol. 15, N 10. — P. 2711–22. doi: 10.1089/ars.2011.4079.
6. Immunohistochemical localization of type IV collagen chains in the basement membrane of the pancreatic duct in human normal pancreas and pancreatic diseases / K. Genichiro [et al.] // *Pancreas*. — 2004 Jul. — Vol. 29, N 1. — P. 61–66.
7. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development / E. Pöschl [et al.] // *Development*. — 2004 Apr. — Vol. 131, N 7. — P. 1619–28.
8. Diagnostic efficiency of amylase and type IV collagen in predicting chronic pancreatitis / S. K. Das [et al.] // *Indian J Clin Biochem*. — 2009 Jan. — Vol. 24, N 1. — P. 60–64. doi: 10.1007/s12291-009-0010-5.
9. Type IV collagen is a tumour stroma-derived biomarker for pancreas cancer / D. Öhlund [et al.] // *Br J Cancer*. — 2009 Jul 7. — Vol. 101, N 1. — P. 91–97. doi:

10.1038/sj.bjc.6605107.

10. Collagen VI is a basement membrane component that regulates epithelial cell-fibronectin interactions / J. F. Groulx [et al.] // *Matrix Biol.* — 2011 Apr. — Vol. 30, N 3. — P. 195–206. doi: 10.1016/j.matbio.2011.03.002.

11. Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop / D. Öhlund [et al.] // *BMC Cancer.* — 2013 Mar 26. — Vol. 13. — P. 154. doi: 10.1186/1471-2407-13-154.

12. Effects of the cytokines on the proliferation of and collagen synthesis by human cataract lens epithelial cells / O. Nishi [et al.] // *Br J Ophthalmol.* — 1996 Jan. — Vol. 80, N 1. — P. 63–68.

13. Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax / M. Ruhl [et al.] // *J Biol Chem.* — 1999 Nov 26. — Vol. 274, N 48. — P. 34361–68.

14. Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-

dependent mechanism / D. Gagné, J. F. Groulx [et al.] // *J Cell Physiol.* — 2010 Feb. — Vol. 222, N 2. — P. 387–400. doi: 10.1002/jcp.21963.

15. Collagen VI deficiency affects the organization of fibronectin in the extracellular matrix of cultured fibroblasts / P. Sabatelli [et al.] // *Matrix Biol.* — 2001 Nov. — Vol. 20, N 7. — P. 475–86.

16. Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity / M. Schnoor [et al.] // *J Immunol.* — 2008 Apr 15. — Vol. 180, N 8. — P. 5707–19.

Адрес для корреспонденции

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, д. 27,
УО «Витебский государственный
медицинский университет»,
кафедра патологической анатомии,
e-mail: victoriya_06@tut.by,
Клопова Виктория Александровна

Сведения об авторах

Самсонова И.В., к.м.н., доцент, зав. кафедрой патологической анатомии УО «Витебский государственный медицинский университет».

Клопова В.А., к.м.н., доцент кафедры патологиче-

ской анатомии УО «Витебский государственный медицинский университет».

Шевченко И.С., старший преподаватель кафедры патологической анатомии УО «Витебский государственный медицинский университет».

Поступила 9.09.2015 г.